

University of Groningen

Stoffwechselwege vom Reißbrett

Breitling, Rainer; Takano, Eriko

Published in:
BIOspektrum

DOI:
[10.1007/s12268-013-0267-3](https://doi.org/10.1007/s12268-013-0267-3)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2013

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Breitling, R., & Takano, E. (2013). Stoffwechselwege vom Reißbrett: neue Ansätze der Naturstoffbiochemie. *BIOspektrum*, 19(1), 30-32. <https://doi.org/10.1007/s12268-013-0267-3>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Synthetische Mikrobiologie

Stoffwechselwege vom Reißbrett: neue Ansätze der Naturstoffbiochemie

RAINER BREITLING, ERIKO TAKANO

MANCHESTER INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY, UNIVERSITY OF MANCHESTER, UK

The biosynthetic pathways leading to high-value natural products, including a wide range of potent drugs, are a particularly promising target for the new approaches of synthetic biology. Their intrinsic modularity lends itself to creative re-engineering at multiple spatial and temporal scales, with the aim of awakening silent biosynthetic pathways, creating novel chemical diversity, or optimizing production efficiency.

DOI: 10.1007/s12268-013-0267-3

© Springer-Verlag 2013

■ Die chemische Vielfalt von Naturstoffen ist erstaunlich (**Abb. 1**). Besonders sesshafte Organismen – Pflanzen, Mikroben, marine Schwämme – haben in einem ständigen evolutionären Rüstungswettlauf ein beeindruckendes Arsenal chemischer Angriffs- und Verteidigungswaffen und „abhörsicherer“ chemischer Kommunikationsmethoden entwickelt. Viele der beteiligten Biochemikalien sind höchst wirksame Effektoren in biologischen Systemen; sie beeinflussen eine Vielzahl von zellulären Prozessen mit hoher Selektivität und sind daher vielversprechen-

de Kandidaten als neue Medikamente. Antibiotika wie Penicillin, Anti-Tumor-Medikamente wie Vincristin oder Taxol sowie Cholesterinsenker wie Lovastatin sind alle samt Abkömmlinge von Naturprodukten und werden teilweise noch heute durch Fermentation von Mikroorganismen produziert.

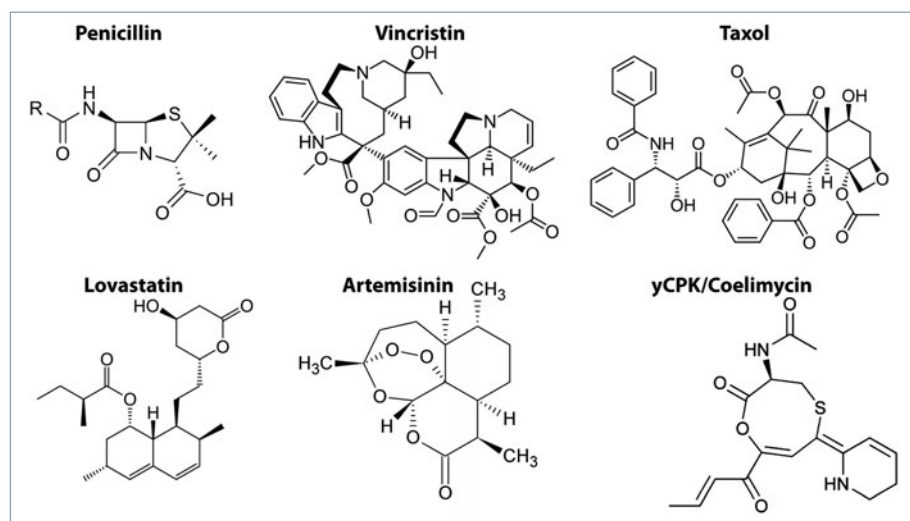
Verborgene Vielfalt

Ein entscheidendes Problem bei der Verwendung von Naturstoffen ist ihre häufig äußerst aufwendige Gewinnung: Sie werden in kleinster Menge in schwierig zu kultivierenden

Organismen produziert. Die ersten Chargen des neu entdeckten Penicillins waren so kostbar, dass sie aus dem Urin der Patienten wiedergewonnen wurden. Missernten des Einjährigen Beifußes (*Artemisia annua*), der Quelle des Anti-Malaria-Medikaments Artemisinin, führen noch heute zu inakzeptablen Preisschwankungen auf dem Medikamentenmarkt. Klassische Mutagenese-Selektionsverfahren können diese Einschränkungen zwar zum Teil überwinden (Penicillin wird heute, nach jahrzehntelanger Optimierung, in mehr als hundertfach höheren Konzentrationen produziert als in den Originalstämmen von Alexander Fleming), aber die Ergebnisse der Genomsequenzierungsprojekte der letzten Jahre zeigen, dass die eigentliche Herausforderung auf einer ganz anderen Ebene liegt: Die Genome gut untersuchter Modellbakterien enthalten oft Dutzende völlig unerwarteter, uncharakterisierter Gencluster, die für Biosynthesewege (vermutlich) neuer Naturstoffe codieren.

Bei der Analyse des kompletten Genoms von *Streptomyces clavuligerus*, einem Antibiotikum-produzierenden Bakterium, fanden wir z. B. gemeinsam mit unseren Kollaborationspartnern vom niederländischen Biotechnologieunternehmen DSM mithilfe speziell entwickelter Software ganze 48 solcher Biosynthesecuster [1] – nur fünf der dazugehörigen Produkte waren bisher in *S. clavuligerus* bekannt, der Rest scheint unter üblichen Testbedingungen nicht produziert zu werden; ein Muster, das sich in zahlreichen Genomen und quer durch den Stammbaum der Mikroorganismen wiederholt, wie wir inzwischen gemeinsam mit der Gruppe von Michael Fischbach, University of California, San Francisco, USA, bei der noch unveröffentlichten Untersuchung von mehr als 1.000 Bakteriengenomen nachweisen konnten.

Das Aktivieren der ruhenden Biosynthesecuster ist manchmal mit relativ einfachen Methoden möglich, wie wir kürzlich für *Streptomyces coelicolor* zeigen konnten [2]: Die Ausschaltung eines clusterspezifischen Regula-



▲ **Abb. 1:** Beispiele für bioaktive Naturstoffe: Penicillin (aus *Penicillium* und anderen Schimmelpilzen), Vincristin (aus Madagaskar-Immergrün, *Catharanthus roseus*), Taxol (aus der Pazifischen Eibe, *Taxus brevifolia*), Lovastatin (aus dem Schimmelpilz *Aspergillus terreus*), Artemisinin (aus *Artemisia annua*, dem Einjährigen Beifuß), und yCPK/Coelimycin (aus dem Actinobakterium *Streptomyces coelicolor*).

torgens bewirkte nicht nur die Produktion des vorher unsichtbaren neuen Pigments yCPK/Coelimycin (und der dazugehörigen antibiotischen Aktivität), sondern unterdrückte gleichzeitig andere, normalerweise produzierte antibiotische Pigmente. Für einen generellen Ansatz zum Aktivieren, Überproduzieren und eventuellen Modifizieren der Tausende in den Genomsequenzen entdeckten neuen Naturstoffe mit potenziell wertvoller Bioaktivität sind aber ehrgeizigere Methoden aus dem Gebiet der Synthetischen Biologie notwendig [3].

Aktivieren von Biosyntheseclustern durch *refactoring*

Refactoring ist ein Konzept aus der Softwareentwicklung und bezeichnet das Neuschreiben eines existierenden Computer-codes „in eigenen Worten“, um die Algorithmen besser zu verstehen, zu optimieren und historisch akkumulierte Eigentümlichkeiten zu entfernen [4]. Für das Aktivieren von Biosyntheseclustern bedeutet das ein Neuschreiben des vorhandenen genetischen Codes, unter Entfernung der natürlichen (und oft versteckt wirksamen) regulatorischen Mechanismen. Der Cluster wird also auf seinen reinen Enzym-codierenden Kern reduziert, die Regulation durch künstliche Elemente (Ribosomen-Bindungsstellen, Transkriptions-Startpunkte, Terminatoren) übernommen. Gut charakterisierte Bibliotheken dieser Elemente erlauben es dann, die biosynthetische Maschine unabhängig von den normalerweise wirksamen Unterdrückungsmechanismen zu aktivieren.

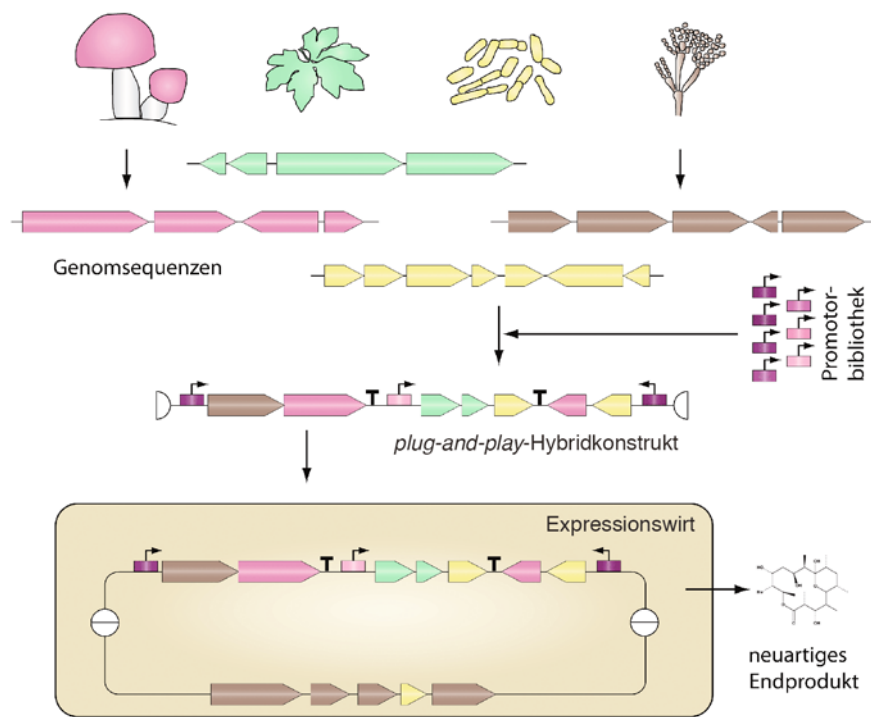
Neue Vielfalt durch Modularität

Für den Mikroben-Ingenieur ist eine Eigenschaft der natürlich

vorkommenden Stoffwechselwege für die Biosynthese von Naturstoffen besonders interessant: Durch den evolutionären Druck, schnell immer neue chemische Strukturen zu produzieren, sind diese auf vielen Ebenen modular organisiert, bestehen also aus Bausteinen, die sich idealerweise leicht austauschen und neu kombinieren lassen (**Abb. 2**, [5]). In den besonders gut untersuchten Beispielen, den Polyketid-Synthasen und nicht-ribosomalen Peptid-Synthasen, ist diese Modularität besonders gut zu sehen, denn hier sind die aktiven Domänen der Enzyme in riesigen molekularen Fließbandstrukturen angeordnet, die in Dutzenden von Einzelreaktionen die Kernstruktur der komplexen Naturstoffprodukte zusammenbauen. Unsere evolutionären Studien der Zusammensetzung von Tausenden Biosyntheseclustern quer durch das Mikrogenreich zeigen aber, dass auch viele andere Reaktionen in modularer Weise zwischen den Organismen ausgetauscht werden – viele davon mit bisher unbekannter chemischer Funktion. Diese Entdeckung bildet jetzt die Grundlage für den Aufbau einer Bibliothek enzymatischer Module, die es in Kombination mit den oben erwähnten Bibliotheken regulatorischer Elemente erlaubt, neue chemische Produkte zu kreieren.

Optimierung durch räumlichen Zusammenbau

Die Möglichkeiten zur weiteren Optimierung betreffen vor allem die Schaffung eines optimalen zellulären Umfelds für die neu entworfenen oder aufgeweckten Stoffwechselwege. Besonders ambitioniert, aber auch besonders vielversprechend ist dabei die Manipulation der räumlichen Anordnung der Reaktionen in ganz verschiede-



▲ **Abb. 2:** Stark vereinfachtes Schema der Synthetischen Biologie von neuen Naturstoffen. Gene oder Genmodule aus verschiedenen Organismen werden in einem wiederverwendbaren *plug-and-play*-Konstrukt kombiniert, unter der Kontrolle ausgewählter Promotoren passender Stärke und effektiver Terminatorsequenzen (T). Dieses Konstrukt kann dann kloniert und in geeigneten Zellen zur Expression gebracht werden, um neuartige Hybridnaturstoffe zu produzieren. Details und konkrete Beispiele werden in [3] und [7] diskutiert.

nen Größenordnungen: von der kleinräumigen Kombination von Reaktionen in künstlichen Proteinkomplexen zur Minimierung von Nebenreaktionen und Optimierung der Stöchiometrie, über die Einbettung von ganzen Stoffwechselwegen in neu generierten Organellen (auch in Bakterien durch die Einführung von proteinbasierten Kompartimenten inzwischen eine realistische Möglichkeit), bis hin zur Verteilung der Synthese auf verschiedene Bakterien in arbeitsteiligen Lebensgemeinschaften [3].

Debugging durch Modellierung und Evolution

Das Design neuer Stoffwechselwege endet nicht mit der Genomsynthese. Die schrittweise Korrektur und Verbesserung – das *debugging* – der neu entworfenen Mikroorganismen erfordern neue diagnostische Verfahren. Insbesondere die umfassende Charakterisierung von Metabolitprofilen (Metabolomik) spielt dabei eine große Rolle [6]. Sie ermöglicht es, festzustellen, ob das gewünschte Endprodukt in der erwarteten Menge produziert wird, aber vor allem, ob eventuell ungeplante Nebenreaktionen ablaufen. Noch wichtiger ist oft die Möglichkeit, mittels Metabolomik direkt zu beobachten, welche Schlüsselmetaboliten an Engpassreaktionen ange-

häuft oder vorzeitig aufgebraucht werden und so die erreichbare Produktion limitieren. Mithilfe von Computermodellen des mikrobiellen Stoffwechsels erlauben solche Daten die weitere Verfeinerung des ursprünglichen Entwurfs [7].

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Kombination der ingenieurwissenschaftlichen Methoden der Synthetischen Biologie mit den Stärken der biologischen Evolution [8]: Die Designer-Mikroben können zunächst mit klassischen Mutagenese-Selektionsver-

fahren optimiert werden, danach werden die aufgetretenen Mutationen durch Genomsequenzierung identifiziert, gemeinsam mit Metabolomikdaten und Computermodellen interpretiert und auf dieser Grundlage die nächste Design-Generation zusammengestellt.

Danksagung

Wir danken allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppen für ihre Beiträge zu den hier vorgestellten Arbeiten und zahlreiche anregende Diskussionen.

Literatur

- [1] Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A et al. (2010) The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol Evol* 2:212–224
- [2] Gottelt M, Kol S, Gomez-Escribano JP et al. (2010) Deletion of a regulatory gene within the *cpk* gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 156:2343–2353
- [3] Medema MH, Breitling R, Bovenberg R et al. (2011) Exploiting plug-and-play synthetic biology for drug discovery and production in microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 9:131–137
- [4] Temme K, Zhao D, Voigt CA (2012) Refactoring the nitrogen fixation gene cluster from *Klebsiella oxytoca*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:7085–7090
- [5] Walsh CT, Fischbach MA (2010) Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. *J Am Chem Soc* 132:2469–2493
- [6] Nguyen QT, Merlo ME, Medema MHM et al. (2012) Metabolomics methods for the synthetic biology of secondary metabolism. *FEBS Lett* 586:2177–2183
- [7] Medema MH, van Raaphorst R, Takano E et al. (2012) Computational tools for the synthetic design of biochemical pathways. *Nat Rev Microbiol* 10:191–202
- [8] Medema MH, Alam MT, Breitling R et al. (2011) The future of industrial antibiotic production: from random mutagenesis to synthetic biology. *Bioeng Bugs* 2:230–233

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Rainer Breitling
Manchester Institute of Biotechnology
University of Manchester
131 Princess Street
Manchester M1 7DN, UK
Tel.: +44-(0)141-306-5117
rainer.breitling@manchester.ac.uk

AUTOREN



Rainer Breitling

2001 Promotion an der TU München. 2001–2003 Postdoc an der San Diego State University, CA, USA. 2003–2005 Postdoc an der University of Glasgow, UK. 2005–2009 Assistant Professor an der Rijksuniversiteit Groningen, Niederlande. 2010–2012 Professor an der University of Glasgow. Seit 2012 Professor of Systems Biology am Manchester Institute of Biotechnology, University of Manchester, UK.



Eriko Takano

1985–1989 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Meiji Seiki Kaisha Forschungsinstitut, Yokohama, Japan. 1990–1994 Promotion an der University of East Anglia, Norwich, UK. 1994–2002 Postdoc am John Innes Centre, Norwich. 2002–2005 wissenschaftliche Assistentin (C1) an der Universität Tübingen. 2006–2012 Assistant/Associate Professor an der Rijksuniversiteit Groningen, Niederlande. Seit 2012 Professor of Synthetic Biology am Manchester Institute of Biotechnology, University of Manchester, UK.